

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-344878

(43)Date of publication of application : 27.12.1993

(51)Int.Cl.

C12M 1/00
C07K 7/02
C12M 3/00
// C12N 11/16

(21)Application number : 03-337590

(71)Applicant : BOEHRINGER INGELHEIM KG

(22)Date of filing : 26.11.1991

(72)Inventor : KUTSCH HORST

(30)Priority

Priority number : 90 4038397 Priority date : 01.12.1990 Priority country : DE

(54) MICROCARRIER FOR ATTACHMENT-REQUIRING CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a microcarrier for attachment-requiring cells.

CONSTITUTION: A microcarrier for living cells are prepared by covalently bonding a novel category of derivatized vesicular material (CSM = cell structure material) comprising the highly purified whole cell aggregate or cell groups originating from sugar beets or cabbages to a substance promoting the adhesion to the living cells. The remaining cell walls are composed of only naturally occurring polysaccharides and this point gives decisive advantage. The vacant inside (vacuoles) can contain a liquid and the substances dissolved therein. The adhesion-promoting substance is known, for example, particularly collagen as collagen R or natural collagen, or protein as laminine and poly-D-lysine or peptide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344878

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/00	Z			
C 0 7 K 7/02		8318-4H		
C 1 2 M 3/00	A			
// C 1 2 N 11/16				

審査請求 未請求 請求項の数6(全 6 頁)

(21)出願番号	特願平3-337590	(71)出願人	390040693 ベーリンガー インゲルハイム コマンデ イトゲゼルシャフト BOEHRINGER INGELHEI M KOMMANDITGESELLSC HAFT ドイツ連邦共和国 デー 6507 インゲル ハイム アム ライン (番地なし)
(22)出願日	平成3年(1991)11月26日	(72)発明者	ホルスト・クーチュ ドイツ連邦共和国 ダブリュ6690 ザンク トベンデル 1, ディリンガーシュトラ ーセ 27
(31)優先権主張番号	P 4 0 3 8 3 9 7 . 0	(74)代理人	弁理士 赤岡 迪夫
(32)優先日	1990年12月1日		
(33)優先権主張国	ドイツ (DE)		

(54)【発明の名称】 足場要求細胞用の微小担体

(57)【要約】

【目的】 足場を必要とする生きた細胞の培養のための微小担体を提供すること。

【構成】 少なくとも1の接着促進物質を有する、植物由来の高度に精製された細胞よりなる小胞状材料 (C S M) を含有することを特徴とする、生きた細胞のための微小担体。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】少なくとも1の接着促進物質を有する小胞状材料を含有することを特徴とする、生きた細胞のための微小担体。

【請求項2】該小胞状材料が20乃至300 μ mの乾燥時粒子サイズを有し且つ膨潤状態で断裂した表面を有するものであることを特徴とする、請求項1に記載の微小担体。

【請求項3】該接着促進物質がタンパク質又はペプチドであることを特徴とする、請求項1又は2に記載の微小担体。

【請求項4】該接着促進物質がコラーゲン、ラミニン又はポリ-D-リジンであることを特徴とする、請求項3に記載の微小担体。

【請求項5】生きた細胞のための微小担体を製造するための小胞状材料の使用。

【請求項6】乾燥した小胞状材料を、生きた細胞への接着を促進する物質と共有結合的に結合させることを特徴とする、生きた細胞のための微小担体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、足場を必要とする細胞特に哺乳類の細胞のための微小担体として働く修飾された担体材料に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】従来技術においては、足場要求細胞のために、ガラス又はプラスチックの表面を有する担体の使用が知られていた。スケールアップは、単にその表面積を拡大することによってなされた。

【0003】1967年以来、微小担体が、足場（anchorage）要求細胞の生育と培養のための代替品の一つとして使用されてきた。使用された担体材料は、多数の材料（ガラス、プラスチック、架橋した多糖類）のうちの一つであろう。接着は、担体表面の化学的修飾によって著しく改善されてきた。大半の場合、この目的のためには、コラーゲンを共有結合的に担体表面に組合せている。微小担体の場合、スケールアップは単に新鮮な担体材料を追加することによって達成される。次いで、既にコロニー形成のなされた担体から新鮮な担体へと細胞の移住が起こる。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、担体材料として使用するための植物由来の高度に精製された全細胞又は細胞群よりなる新規範疇の誘導体化された小胞状材料（CSM＝細胞構造状材料）を提供する。

【0005】残存するその細胞壁は天然の多糖類のみからなっており、このことが決定的利点を有する。その空虚な内側（空胞）は、液体とそれに溶解した物質を収容することができる。

2

【0006】そのような材料のクロマトグラフィー用媒体としての製造及び一般的用途については、既に東ドイツ特許第247570号に開示されている。

【0007】通常材料と異なり、本材料は完全に生物学的といえる。通常担体材料の表面が多かれ少なかれ規則正しい形状をしているのに対し、小胞状材料の表面は幾何学的に複雑な、半天然の断裂した構造を有しており、細胞の接着を助ける。

【0008】本発明の修飾された担体材料は、次の方法で製造することができる。すなわち、乾燥した小胞状材料を篩にかけ、20乃至300 μ mのサイズ（顆粒サイズ）とする。60乃至125 μ mの粒子サイズがより好ましい。篩にかけた材料を、乾燥した該小胞状材料が浸って膨潤するような液量の10乃至50mMのNaIO₄溶液（pHを酸性にしておく）と混合する。材料をこの溶液中に30乃至180分間放置して酸化し、次いで水、できれば蒸留水で数回洗浄する。好ましい酸化剤は20mM/LのNaIO₄を含有する0.15Mのリン酸緩衝液（pH＝4.5）であり、小胞状材料をこの溶液中で60分間処理する。

【0009】この方法で処理し洗浄した材料を、次いで、薄いタンパク質水溶液中で終夜インキュベートする。このタンパク質溶液の濃度及び溶液温度は、該タンパク質に適するように調節する。温度に関しては、それは室温（約20℃）を超えてはならない。コラーゲンの場合、処理温度4℃で1重量%の水溶液が好ましいことが判明している。次いで、タンパク質で被覆された小胞状材料を、グリシン又はグリシンアミドの水溶液、例えば0.5Mのグリシン水溶液中で約1時間インキュベートすることにより更に加工する。次いで、水性溶媒中において、適当な還元剤を用いて、例えば水素化ホウ素ナトリウム（NaBH₄、水性緩衝液中0.1%）を用いて4℃にて約20分間、アゾメチン結合の水素添加を行うことができる。1Mのリン酸緩衝液が好ましく、pHを一定に維持するため乾燥緩衝剤を追加する。次いで材料を水で再度十分に洗浄し、今や準備のできた微小担体を0.9重量%の塩化ナトリウム水溶液に懸濁させる。

【0010】本発明の微小担体の他の主な利点は、それが専ら生物学的材料よりなり、生きた細胞用の従来知られている担体に比して製造が容易で安価であるということである。本発明によれば、この種の小胞状材料は、該小胞状材料の断裂した表面に接着を促進する物質を共有結合的に結合するよう修飾が加えられる。この種の接着促進物質は公知であり、例えば、特に、コラーゲンR又は天然のコラーゲン等のコラーゲン、ラミニン及びポリ-D-リジン等のタンパク質やペプチドである。本発明の微小担体は、足場要求性の生きた細胞用の担体材料として使用することができる。生きた細胞を伴うこの種の系の調製は先行技術より知られる。

【0011】CSMの性質上、滅菌はガンマ線照射（線

量5乃至10kGy)によって行なうのが好ましい。照射による担体の損傷(ラジカル反応)を回避するためには、0.1%又はそれ以上のヒスチジン又はヒスチジンアミド又は他のラジカル捕捉剤を懸濁溶液に加えることができる。

【0012】共有結合的に結合したコラーゲンの代りに、本発明の微小担体はまた、共有結合的に結合した他のタンパク質又はペプチドを接着要素として含有することもできる。これらは例えば、(1) ラミニン(糖タンパク質、分子量約10⁸、上皮細胞又は内皮細胞用)、(2) ポリ-D-リジン(分子量30000乃至70000、又は70000乃至150000)である。

【0013】本発明の微小担体上で生育する動物細胞の例としては、

- (1) V79ハムスター肺繊維芽細胞
- (2) ヒト内皮細胞
- (3) ハムスター腎細胞
- (4) チャイニーズハムスター卵巣細胞

が含まれる。

【0014】

【実施例】以下の実施例は、本発明を、その範囲を限定することなく説明することを意図したものである。

小胞状担体材料の製造例

本例は、砂糖大根より製する材料である。

1. 水道水を用いて、細胞培養物より細胞凝集物を十分に洗浄する。

【0015】2. リン酸含有エタノール(80乃至90%エタノール1L中リン酸1mLを含有)を細胞凝集物の充填物に加えて洗う。3乃至4Lの充填物に対し、約7Lの酸性エタノールを要する。流出する抽出液が澄明かつ明るい黄色になるや否や、直ちに流出口にてエタノールを再生用に回収する。次いで、細胞凝集物が脱色されかつ流出する抽出液(約6L)が無色となるまで、96%エタノールで抽出を続ける。

【0016】3. エタノールで湿った充填物を、次いで、6Lの1%リン酸(Na_2HPO_4 を用いてpH2.5に調整)ですすぐ。すすぎは、流出するエタノールの水分含量が約40%になった時完了する。

【0017】4. 次いで充填物を3Lの蒸留水で2回攪拌し、そして固化するまで攪拌しながら、水を切る。次いで、固定床で3Lの蒸留水で溶出を行う。

【0018】5. 蒸留水の添加により、充填物を約6Lの液量の懸濁液へと調整する。次いで懸濁液をpH6.5とし、7gのKClを加える。0.3Lのトリプシン溶液(約23g/L)を懸濁液に混ぜ込む。

【0019】6. ゆっくり攪拌しながら、混合物を20乃至25℃にて24時間保持する。次いで、更に0.3Lのトリプシン溶液を上記(5)と同様に加える。

【0020】7. 約48時間後、5mLの中性のイオ

ン性界面活性剤(濃厚液)を加える。蒸留水ですすぎを行う。

【0021】8. 水で湿った充填物を、次いで、約6Lの0.5%NaCl溶液で洗浄する。次いで充填物を3Lのセーレンセン緩衝液(pH7)に懸濁させ、そして緩衝液を流出させる。次いで3Lの蒸留水を充填物に浸み込ませる。

【0022】9. 上記(8)に従って得た混合物は、次いで湿式篩にかけるか、又は風乾し次いで乾式篩にかけることができる。

【0023】小胞状担体材料の製造例

本例は、キャベツより製する材料である。

1. 洗浄したキャベツより葉を除いて刻む。次いでこれを水道水で十分に洗浄する。

【0024】2. 100乃至120kgの刻んだ原料を、酸性にした水(水400L+リン酸1L+ Na_2HPO_4 0.2kg)中で4乃至10℃にて24乃至48時間インキュベートする。次いで水を切りエタノール(50%、次いで70%)で洗浄する。

【0025】3. 水性エタノール廃液を切った後、材料を約60℃の温度にて80乃至90%のエタノールで抽出する。脂質成分は溶出し、水は追い出される。

【0026】4. 植物材料を水で洗浄する。洗浄水を切った後、塊を100Lのトリプシン溶液(約0.04kgのトリプシンを含有)中に懸濁させ、20乃至25℃にて48乃至50時間ゆっくりと攪拌する。懸濁溶液のpHは6.5とする。

【0027】5. 懸濁溶液を切った後、洗浄流出液がニンヒドリン反応陰性となるまで充填物を攪拌しながら数回洗浄する。

【0028】6. 次いで材料を苔のようにほぐし、もう一度(水で)洗浄し、そしてエタノール(勾配50-70-80-90-96%)で脱水する。

【0029】7. 乾燥は温風下に行う。乾燥した材料は、次いで、粉碎することができる。

【0030】1. 脱色及び脂質抽出

1.1 細胞凝集物を篩つき容器に集め水道水で洗浄する(操作は減圧にすることなく行う)。

【0031】1.2 細胞凝集物をリン酸含有エタノール(80乃至90%エタノール1L中リン酸1mL)で脱色する。この酸性エタノールは最初少量ずつ充填物に2回加える(充填物体積の10%未満)。エタノールを初めて加える前に、最初にエタノール勾配が充填物を通過するよう、充填物が僅かに水に浸るようしておかなければならない。充填物に約0.5Lの酸性エタノールが浸透した後、材料を6Lの酸性エタノールで覆う。抽出は減圧にすることなく固定床で行う。流出する抽出液が澄明かつ明るい黄色になるや否や、直ちに再生のため、流出口でエタノールを捕捉する。次いで96%エタノールで、細胞が脱色されかつ流出する抽出液が無色と

なるまで抽出を続ける(約6L)。

【0032】2. 原形質の酵素的溶解と抽出(充填物体積が3乃至4Lの場合)

2. 1 エタノールを含む充填物を6Lの1%リン酸緩衝液ですすぐ。必要量は、1%リン酸(工業用を飽和 Na_2HPO_4 溶液を用いて、電位差滴定でモニターしながらpH2.5とすることによって調製する。流出するエタノールを捕捉する。操作は減圧にすることなく行う。最初に、充填物上にエタノールがいくらかある限り、少量の緩衝液を充填物の表面にかき混ぜる。この操作の間重要なことは、表面上に塊ができるのを避けることである。充填物が固化した後、3Lのリン酸緩衝液を2回注ぎ、エタノールを水分含量が40%(スピンドル)となるまで回収する。

【0033】2. 2 次いで充填物を3Lの蒸留水で2回攪拌し、そして攪拌しながら固化するまで水切りをし、次いで固定床を3Lの蒸留水で抽出する。

【0034】2. 3 湿った塊を10Lの容器に移す。篩つき容器に付着している残渣は全て蒸留水を用いてこの10Lの容器に洗い込む。蒸留水を加えることにより、懸濁液の液量を約6Lに調整する。電位差滴定でモニターしながら、飽和 Na_2HPO_4 溶液で懸濁液をpH6.5に調整し、次いで、7gのKClと3gの NaN_3 を懸濁液に混ぜ込む。7gの細胞培養用トリプシン(ベルガー社(クラインマハノー)製)を0.3Lの蒸留水に完全に混ぜそして細胞凝集物の懸濁液に混ぜ込む。容器に蓋をし、室温(20乃至25℃)に合わせる。24時間後、更に7gのトリプシンを上記の方法で加える。

【0035】2. 4 約48時間後、細胞凝集物を洗浄する。5mLの濃厚中性洗剤(アルキルスルホン酸ナトリウム)を懸濁液に加え、残渣を全て蒸留水で洗い出しつつ懸濁液を全て篩つき容器に移し、塊を沈澱させ、3Lの0.5%NaCl溶液で2回攪拌する。次いで、塊を6Lの0.5%NaCl溶液で覆い、間隔の詰った充填物として洗浄する。続いて、3Lの0.1Mリン酸緩衝液、pH7(セーレンセン)で攪拌する。固化した後、3Lの蒸留水を含浸させ、次いで表面をエタノールで濡らす。エタノールが浸み込む間、充填物の表面を緩やかに攪拌し、次いで80乃至90%エタノール(1.5L)で覆う。この80乃至90%のエタノールが浸み込んだ後、96%エタノール(4L)を加える。エタノールは減圧にすることなく充填物を通過する。通過するエタノールは、濃度が60%を超えるや否や直ちに回収する。

【0036】3. 乾燥

大型の吸引漏斗中、水流ポンプによる減圧下に、エタノールを含有する塊から移動し得るエタノール部分を除去する。同時に、プラスチックのスパテルで、塊を吸引漏斗の縁におしつける。次いで96%エタノールとn-

ブタノール(比率10/1)の混合物1Lで覆う。このエタノール/ブタノール混合物が浸み込んだ後、充填物を吸引乾固するが、このとき、表面の粉末をほぐして吸引漏斗の縁におしつけ、吸引濾過によってアルコール混合物が均等に除去され得るようにする。吸引びんに集まるアルコールを蒸留用に回収する。完全に吸引濾過されてアルコールで湿っている粉末を回転式エバポレーター中で乾燥する。粉末が適当に攪拌され、塊が形成されないよう、弾力のある材料(例えばポリアミドのケーブル)でできたループを丸底フラスコ内にしておくよう注意しなければならない。塊の形成は、湿った材料を予め篩にかけることにより完全に回避できる。回転式エバポレーターのフラスコを水浴(水温70℃)で加熱する。丸底フラスコを該材料で1/3まで満たすべきである。ポリアミドシルクのフィルターをフラスコの首に設けなければならない。そのものの機能は、乾いた粉末が丸底フラスコから吸い出されるのを防ぐことにある。

【0037】

砂糖大根から製した小胞状担体材料の誘導体の製造

本例は、コラーゲン誘導体の例である。

1. 湿式篩にかけた細胞凝集物(150乃至300 μm)を過ヨウ素酸塩溶液(50mMの NaIO_4 +500mLのMERCK緩衝液、pH4+2000mLの蒸留水、室温)に懸濁させる。2. 5Lの過ヨウ素酸塩溶液に対して、水分含有細胞塊は約1kgを超えてはならない。

【0038】2. 混合物を暗所で室温にて約1時間ゆっくりと攪拌する。

3. 混合物を濾過して蒸留水で十分に洗浄する。

4. 湿った塊を、約1Lのコラーゲン溶液(0.3乃至1%)中でゆっくり攪拌しながら4℃にて終夜インキュベートする。

5. 次いで、蒸留水で十分に洗浄する。

【0039】6. 2.5gの NaBH_4 を1.5LのMERCK緩衝液、pH7、に溶解する。植物細胞塊を新鮮な溶液に攪拌しながら加え、約10℃にてさらに30分間ゆっくりと攪拌する。初期pHは約8、最終pHは約9である。

【0040】7. 混合物を蒸留水で十分に洗浄し、できあがった水で湿った材料を0.9%のNaCl溶液に懸濁させる。続いて照射を行う(ガンマ線、約7kGy)。

【0041】〔本発明の担体材料上での生きた細胞の培養例〕

細胞株: CHO-K1(ATCC CCL 61)、BHK 21(c-31)(ATCC CCL 10)

【0042】上記の細胞株を選んだ理由は、それらがAT III, 第VIIII因子, インターロイキン類及びインターフェロン類のような多数の組換え産物の製造のための、遺伝子的修飾を受けた多数の細胞株の出発細胞

株としての役割を果たすからである。原則として、これらの出発細胞株は、接着特性に関しては、遺伝子的修飾を受けた産物たる細胞株と大差がない。従って、出発細胞株で得られたデータは、産物たる細胞株の大多数に適用することができる。

【0043】(1) スピナーフラスコ中での実験

担体濃度： 63 g/L, 砂糖大根CSMコラーゲンゲル

反応液量： 100又は500 mL

回転速度： 40回転/分

温度： 37℃, インキュベーター設定：7.5%CO₂ 含有空気, 相対湿度95%

pH： 7.0乃至6.6

培地： ダルベッコ氏変法イーグル培地 (DMEM) を80体積%, トリプトースリン酸ブイオンを10体積%及び牛胎仔血清 (FCS) を10体積%

播種濃度： 2×10^5 個/mL

【0044】(2) 孵卵器中での試験

担体濃度： 63 g/L, 砂糖大根CSMコラーゲンゲル

回転速度： 45回転/分

温度： 37℃

pH： 6.9

pO₂： 40%空気飽和

培地： ダルベッコ氏変法イーグル培地 (DMEM) を80体積%, トリプトースリン酸ブイオンを10体積%及び牛胎仔血清 (FCS) を10体積%

反応液量： 2.2 L

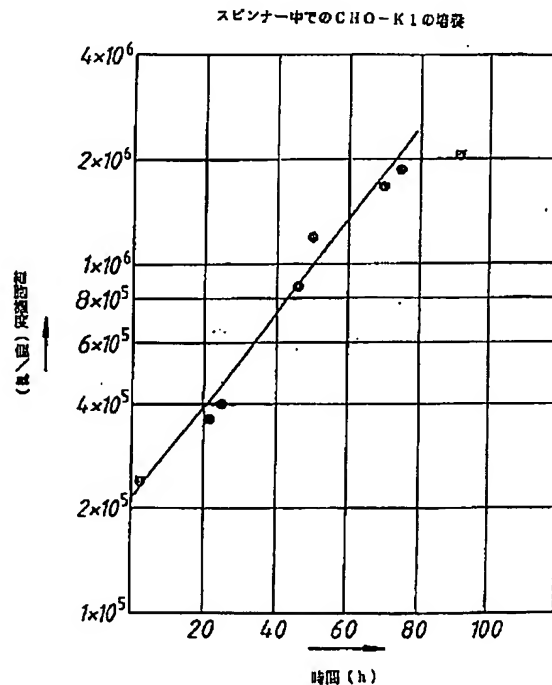
【0045】〔解析〕YSI製の分析器を用いてグルコースと乳酸とを酵素的に測定した。担体に結合していない遊離の細胞は血球計数器中で直接計数した。担体に結合している細胞については、この「Vesipor」材料中の細胞をトリプシン/EDTA溶液を用いて担体から脱離させ、次いで血球計数器中で計数した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 砂糖大根CSMコラーゲン上でのCHO-K1細胞の生育特性を示す。

【図2】 砂糖大根CSMコラーゲン上でのBHK 21細胞の生育特性を示す。

【図1】



【図2】

